

Ingrés d'Acadèmics corresponents

DESCOBRIMENT I DESENVOLUPAMENT D'UNA PLATAFORMA TERAPÈUTICA NOVA PER AL TRACTAMENT DE MALALTIES AUTOIMMUNES

Pere Santamaria i Vilanova

Acadèmic corresponent.

Les malalties autoimmunes són debilitadores, progressives i, en molts casos, tenen conseqüències fatals. Hi ha >80 malalties autoimmunes i >100 milions d'afectats a Europa i Amèrica, fent augmentar de manera directa el cost anual en salut a >200 mil milions d'euros. La complexitat de les respostes espontànies autoimmunes és una barrera pel disseny d'estratègies que puguin purgar selectivament el sistema immunitari d'autoreactivitat sense danyar la immunitat sistèmica. Mentre que amb estratègies immunosupressores no específiques d'antigen s'han obtingut alguns bons resultats en assaigs clínics, aquestes estratègies tenen poc impacte en la progressió de la malaltia i tendeixen a comprometre la immunitat contra infeccions i càncer.

LA COMPLEXITAT AUTOANTIGÈNICA EN LES MALALTIES AUTOIMMUNES: UNA BARRERA PER SUPERAR

Les malalties autoimmunes estan causades per un atac del sistema immunitari cap als teixits propis. La teràpia ideal hauria de ser capaç d'aturar la resposta autoimmune de manera selectiva (contra tots els epitops antigènics diana per aquella malaltia) sense afectar a les respostes immunitàries contra els neoantigens (ex. d'un tumor) o antigens forans. Malauradament, les especificitats de les cèl·lules T i B implicades en qualsevol de les malalties autoimmunes són moltes i estan definides de manera incompleta, fent d'aquest un punt extremadament desafiant. Nosaltres hem descobert recentment una nova plataforma terapèutica que opera sota un nou paradigma que supera aquesta barrera.

LA COMPLEXITAT CEL·LULAR I AUTOANTIGÈNICA DE LA DIABETIS DE TIPUS 1 (T1D PER TYPE 1 DIABETES)

La T1D està causada per una resposta autoimmune crònica contra les cèl·lules beta pancreàtiques. La destrucció de les cèl·lules a tant en humans com en ratolins de la soca NOD (per Non Obese Diabetic), els quals desenvolupen una forma de diabetis similar a la T1D humana, té lloc per efecte dels limfòcits T que reconeixen diferents antigens (1, 2). Evidències recents suggereixen que la progressió de la T1D requereix limfòcits B i limfòcits T CD4+ i CD8+; que les cèl·lules T autoreactives es diferencien en «killers» en resposta al reconeixement dels antigens específics de cèl·lula beta

presentats per les cèl·lules presentadores d'antigen (APCs per antigen-presenting cells); i que aquestes cèl·lules B i T estan dirigides contra un repertori divers d'autoantigens (2, 3) (Fig. 1).

REVERSIÓ DE LA T1D MITJANÇANT UNA ESTRATÈGIA ESPECÍFICA D'ANTIGEN BASADA EN NANOTECNOLOGIA: UNA DESCOBERTA FORTUÏTA

Està establert que, *in vivo*, pèptids solubles poden induir tolerància específica en cèl·lules T, però no poden bloquejar respostes autoimmunes poliespecífiques (4).

Donat que els pèptids són més tolerogènics quan són presentats per molècules del complex major d'histocompatibilitat (MHC per major histocompatibility complex) que quan estan en solució (5), nosaltres vàrem hipotetitzar que el lliurament simultani de diferents pèptids rellevants per la T1D acomplexats a molècules del MHC (pMHC per peptide-MHC) mitjançant nanopartícules (NPs) permetria el tipus de teràpia combinatòria autoantigènica necessària per bloquejar la T1D. Sorprenentment, vàrem observar que la teràpia amb NPs recobertes amb un únic pMHC rellevant per la T1D (utilitzat com a control negatiu en aquests experiments) era capaç de bloquejar la progressió de la T1D en els ratolins NOD i restaurar la normoglicèmia en els ratolins diabètics (6). Encara més sorprenent, fou trobar que la teràpia pMHC- NP no funciona eliminant les cèl·lules T efectores patogèniques. De fet actua expandint cèl·lules T autoreguladores: cèl·lules T autoreactives amb experiència autoantigènica que inhibeixen i maten les cèl·lules APC carregades d'autoantigens, impedit així el recrutament d'altres cèl·lules T patogèniques amb altres especificitats. Recentment hem establert que el paradigma descobert amb les NPs recobertes per pMHC de classe I, que expandeixen cèl·lules T autoreguladores CD8+, també és aplicable a NPs recobertes per MHC de classe II, que expandeixen cèl·lules autoreguladores CD4+.

EL PARADIGMA: L'AUTOIMMUNITAT GENERA CÈL·LULES T DE MEMÒRIA AUTOREGULADORES

Les observacions anteriors han permès el descobriment d'un nou paradigma sobre la progressió de l'autoimmunitat indicant que

l'estimulació crònica de cèl·lules T CD8+ o CD4+ autoreactives per epítops endògens desencadena la seva diferenciació en cèl·lules T autoreguladores de memòria (memory-like); i aquestes cèl·lules autoreguladores de memòria suprimen l'activació de les cèl·lules autoreactives T patogèniques, tant afins com no afins al pMHC que recobreix les NPs, mitjançant la inhibició i la mort de les cèl·lules APC carregades d'autoantígens (6) (Fig. 2). Les principals proves experimentals que recolzen els principis d'aquest paradigma han estat revisades recentment i no es discutiran aquí donat les limitacions d'espai (7). Podem resumir-ho dient que aquest paradigma prediu que qualsevol especificitat única d'epítop (pMHC) implicada en una malaltia autoimmunitària pot ser utilitzada, si es fa servir com a lligand recobrint una NP, per bloquejar respostes autoimmunitàries complexes.

APROFITANT EL PARADIGMA: NANOVACUNES PEL TRACTAMENT DE MALALTIES AUTOIMMUNITÀRIES

Ens referim a les nostres nanomedicines basades en les pMHC com a «nanovacunes» ja que induïen a unes cèl·lules T de memòria altament específiques i amb activitat terapèutica contra l'autoimmunitat. Aquest paradigma i via terapèutica permeten el disseny racional de nanovacunes específiques de malaltia per la majoria de, sinó tots, els trastorns autoimmunitàries. Les 10 nanovacunes pMHC diferents que hem provat fins ara tenen una eficiència terapèutica similar independentment de la prevalença, dominància o el rol específic de l'antigen emprat en el procés de la malaltia. Vull emfatitzar que la NP és essencial, perquè pMHCs multimèrics solubles no poden induir el tipus de resposta autoreguladora que indueixen els seus homòlegs acoblats a les NP (veure (6), (7)). Les NPs permeten un grau superior de multimerització dels pMHC, atorgant-los més potència de crossreacció amb el receptor d'antigen de les cèl·lules T diana (7). A més, vull destacar que aquestes preparacions de NPs no poden activar cèl·lules T naïves i per tant induir respostes efectores (patogèniques) perquè manquen de molècules co-estimuladores clau, com són el CD80 i el CD86. Així doncs, aquest paradigma i aquesta estratègia terapèutica que han permès aquesta descoberta, proporcionen una plataforma per a una nova classe de teràpia en autoimmunitat, potencialment capaç per resoldre totes les respostes autoimmunitàries policlonals d'una manera específica de malaltia i d'òrgan, sense comprometre la immunitat sistèmica (6).

La eficiència d'aquesta estratègia terapèutica ha estat provada exhaustivament en diferents models de ratolí presentant malalties autoimmunitàries i sembla ser molt millor que altres teràpies existents o concurrents en desenvolupament. Específicament, el tractament dels ratolins diabètics espontanis NOD (per nonobese diabetic) o dels C57BL/6 presentant EAE experimental (per experimental autoimmune encephalomyelitis) i utilitzats com a model per l'esclerosi múltiple, amb NPs recobertes amb complexos pMHC rellevants per la malaltia, de classe I (6) o de classe II (X. Clemente-Casares and P. Santamaria, observacions no publicades) poden restaurar la

normoglicèmia en ratolins diabètics o la funció motora en ratolins paralítics severos, respectivament.

Una altra propietat important d'aquestes nanovacunes és que els seus efectes poden ser mesurats, en base al pacient individual, amb biomarcadors precisos de l'eficiència terapèutica. Com he explicat, la teràpia pMHC-NP expandeix les cèl·lules T reguladores amb «experiència» d'autoantigen (ex. cèl·lules de memòria), específiques de la malaltia i de manera específica d'epítop.

Aquesta expansió és sistèmica, correlaciona amb l'eficiència terapèutica, incloent la durada de la reversió de la malaltia, i pot ser monitoritzada mitjançant l'anàlisi de la sang perifèrica.

LES NPS RECOBERTES AMB PMHC DE CLASSE II EXPANDEIXEN *IN VIVO* CÈL·LULES T REGULADORES DE TIPUS 1 ESPECÍFIQUES DEL TRASTORN I PERMETEN L'IMMUNOSSUPRESSIÓ ESPECÍFICA DE MALALTIA

Tot i que el nostre treball inicial va ser realitzat amb NPs recobertes de pMHC de classe I operant via cèl·lules CD8+ autoreguladores, hem establert que aquest nou paradigma també s'aplica al compartiment de cèl·lules CD4+ (X. Clemente-Casares and P. Santamaria, observacions no publicades). Invariablement, la teràpia basada en les NPs recobertes de pMHC de classe II opera via cèl·lules T CD4+ reguladores de tipus 1 (Tr1) autoreactives, el fenotip de les quals, el perfil de citokines i la funció, són essencialment idèntiques a les descrites per les cèl·lules Tr1 CD4+ humanes circulants en sang, tant d'individus sans com en pacients presentant malalties autoimmunitàries (8, 9). Tenim nombroses dades sobre els mecanismes pels quals aquestes cèl·lules

Tr1 expandides *in vivo* suprimen la malaltia autoimmunitària en ratolins i indueixen la secreció de citokines immunosupressores i la mort de les APCs carregades amb autoantígens, els quals semblen ser els mateixos en el cas de les cèl·lules Tr1 humanes (9, 10). La supressió és completament específica de malaltia perquè només són atacades les APCs que presenten els pMHC afins a les cèl·lules T expandides per la nanovacuna. Aquest fet ha estat comprovat experimentalment: els ratolins tractats amb NPs recobertes de pMHC de classe II poden eliminar infeccions virals i adreçar respostes d'anticossos contra antígens forans.

EVIDÈNCIES QUE RECOLZEN EL POTENCIAL TERAPÈUTIC EN AUTOIMMUNITAT DE LES CÈL·LULES TR1

Les cèl·lules Tr1 foren descobertes en pacients tolerants a transplantaments (11) i es pensa que sorgeixen en resposta a l'exposició crònica antigènica. Hi ha evidències substancials tant en humans com en ratolins de que les cèl·lules Tr1 regulen les respostes autoimmunitàries suprimint la presentació d'antígens (9, 10). La transferència adoptiva de cèl·lules Tr1 expandides *ex-vivo* ha provat l'eficiència terapèutica en humans. Per exemple, un assaig clínic recent en fase I/II utilitzant cèl·lules Tr1 expandides *ex-vivo* de pacients amb malaltia de Crohn refractària a altres teràpies, donà un 75% de resposta

i un 38% de percentatge de remissió (12, 13). Les nostres nanovacunes expandeixen (*in vivo*) les cèl·lules Tr1 específiques de la malaltia fins a nivells 900 vegades superiors als obtinguts per aquestes respostes clíniques en pacients mitjançant transferència adoptiva de cèl·lules T.

PODRAN AQUESTES NANOVACUNES BASADES EN PMHC BLOQUEJAR LES MALALTIES AUTOIMMUNES MEDIATEDES PER AUTOANTICOSSOS?

Un nombre de malalties autoimmunes està mediat per autoanticossos IgG, els quals estan produïts per cèl·lules B que han patit recombinació de classe d'Immunoglobulina (Ig). Aquest procés és depenent de les cèl·lules T-helper (Th) CD4+, de manera que les cèl·lules Th autoreactives lliguen tant el CD40 com les pMHC afins de classe II de les cèl·lules B autoreactives que han capturat autoantígens via les Ig de membrana. Aquesta interacció entre cèl·lules Th i B afins es un requeriment *sine-qua-non* perquè hi hagi recombinació de classe d'Ig i diferenciació de la cèl·lula B cap a cèl·lula plasmàtica secretora d'autoanticossos. Aquest requeriment de col·laboració entre cèl·lules Th i B en les malalties autoimmunes mitjançades per autoanticossos, juntament amb l'observació de que les cèl·lules Tr1 poden suprimir eficaçment la immunitat humoral (14), faria possible bloquejar la seva progressió mitjançant el tractament de NPs recobertes amb complexos pMHC capaços de dirigir respostes mitjançades per cèl·lules T reguladores específiques de malaltia.

TERÀPIA DE NANOVACUNA VS. TERÀPIES CONCURRENTS

La plataforma terapèutica de nanovacunes ofereix uns avantatges tecnològics significatius quan es compara amb altres productes actualment comercialitzats: (i) és específic d'antigen; (ii) restaura l'homeostasi immune; i (iii) és fàcilment translacional. Respecte als punts (i) i (ii) tot el nostre treball preclínic fins ara indica que la plataforma tecnològica de les nanovacunes representa el tractament ideal per a la autoimmunitat tant buscat fins ara: una teràpia que restaura la tolerància immunològica sense comprometre la immunitat sistèmica. Referent a (iii) la seva translacionalitat, les etapes pel desenvolupament de les nanovacunes per diferents indicacions són totes altament estandaritzables i modulars. Per exemple, ens podem beneficiar del fet que dues nanovacunes poden tenir aplicacions clíniques radicalment diferents però només diferir en la composició global per només 8-25 aminoàcids corresponents al pèptid antigènic específic de la malaltia, en els seus dominis proteics respectius. Això significa que quasi tots els processos i protocols desenvolupats a partir de R&D, producció, selecció i validació de candidats, assajos preclínic i clínics per a qualsevol de les nanovacunes, gaire bé segur que podran ser aplicats a una àmplia gamma d'altres nanovacunes. A més, tota evidència fins avui indica que aquestes nanovacunes són segures. No són tòxiques en ratolins, inclús després de múltiples dosis, i estan composades per dos ingredients, que utilitzats de manera individual, s'ha demostrat que són segurs en humans: (i) nanopartícules

d'òxid de ferro, les quals estan aprovades pel tractament de l'anèmia crònica en pacients amb desordres crònics del ronyó o en les proves de ressonància magnètica (a dosis fins a 500 vegades superior en humans que la dosi equivalent utilitzada per revertir la malaltia autoimmune en el ratolí); i (ii) complexos pèptid-MHC, els quals foren utilitzats com a complexos solubles en assajos de fase II a principis dels anys noranta, tot i que no tingueren èxit terapèutic.

POTENTIAL DE COMERCIALIZACIÓ

El potencial clínic i de mercat de les nanovacunes basades en pMHC és enorme. En un article del 2011 titulat « *The Cost Burden of Autoimmune Disease: The Latest Front in the War on Healthcare Spending* », l'Associació Americana per les Malalties Associades a l'Autoimmunitat i la Coalició Nacional dels Pacients de desordres Autoimmunitaris, han declarat que el cost anual per les malalties autoimmunes és de 100 mil milions de dòlars - tenint en compte que aquest valor, amb quasi total seguretat, està subestimat. Aquest cost sorprenent, va acompanyat per una estimació igualment impactant sobre el nombre d'Americans i Europeus que viuen amb una malaltia autoimmune - més de 100 milions. L'article continua dient que els costos i el nombre de pacients en la resta del món són igualment aclaparadors. Amb un cost financer i un peatge en el sofriment humà a tal escala no és difícil comprendre que hi ha un ampli mercat en la necessitat mèdica encara no satisfeta per les nanovacunes amb èxit en el camp de les malalties autoimmunes.

TAULA I. PROPIETATS DE LES NANOVACUNES BASADES EN PMHC

- Aquesta plataforma explota un paradigma immunològic nou i transporta la recerca bàsica cap a una aplicació innovadora pel tractament de les malalties autoimmunes;
- Aquesta estratègia és de fet una vacuna; indueix i expandeix cèl·lules T de memòria específiques d'autoantígens, de manera similar a les vacunes convencionals (excepte que aquelles indueixen la memòria reguladora com a oposició a la memòria efectora)
- Aquesta tecnologia de la plataforma de les nanovacunes està basada en l'efecte de la vacunació, desencadenant una resposta immune;
- Totes les nanovacunes per l'autoimmunitat basades en la nostra plataforma tenen un disseny similar i operen a través del mateix mecanisme d'acció amb una eficiència similar;
- Nosaltres hem documentat fins avui efectes impressionants de reversió de la malaltia en dos desordres autoimmunes diferents;
- Les teràpies existents per les malalties autoimmunes són drogues no específiques ni d'antigen ni de malaltia que no reajusten la resposta autoimmune (i per tant no són curatives) i tenen efectes immunosuppressors generals. La nostra plataforma de nanovacunes ha demostrat una eficiència superior a les teràpies existents en models animals, i especificitat de malaltia, l'objectiu llargament buscat en aquest camp. Crea immunosuppressió de llarga durada, altament eficient i específica de malaltia.

REFERÈNCIES

1. Lieberman, S., and DiLorenzo, T. 2003. A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 62:359-377.
2. Tsai, S., Shameli, A., and Santamaria, P. 2008. CD8+ T-cells in autoimmune diabetes. *Adv. Immunol.* 100:79-124.
3. Santamaria, P. 2010. The long and winding road to understanding and conquering type 1 diabetes. *Immunity* 32:437-445.
4. Han, B., Serra, P., Amrani, A., Yamanouchi, J., Maree, A., Edelstein-Keshet, L., and Santamaria, P. 2005. Prevention of diabetes by manipulation of anti-IGRP autoimmunity: high efficiency of a low-affinity peptide. *Nat Med* 11:645-652.
5. Miller, S., Wetzig, R., and Claman, H. 1979. The induction of cell-mediated immunity and tolerance with protein antigens coupled to syngeneic lymphoid cells. *J Exp Med* 149:758-766.
6. Tsai, S., Shameli, A., Yamanouchi, J., Clemente-Casares, X., Wang, J., Serra, P., Yang, Y., Medarova, Z., Moore, A., and Santamaria, P. 2010. Reversal of autoimmunity by boosting memory-like autoregulatory T cells. *Immunity* 32:568-580.
7. Clemente-Casares, X., Tsai, S., Yang, Y., and Santamaria, P. 2011. Peptide-MHC-based nanovaccines for the treatment of autoimmunity: a «one size fits all» approach? *Journal of molecular medicine* 89:733-742.
8. Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev* 212:28-50.
9. Tree, T.I., Lawson, J., Edwards, H., Skowera, A., Arif, S., Roep, B.O., and Peakman, M. 2010. Naturally arising human CD4 T-cells that recognize islet autoantigens and secrete interleukin-10 regulate proinflammatory T-cell responses via linked suppression. *Diabetes* 59:1451-1460.

10. Magnani, C.F., Alberigo, G., Bacchetta, R., Serafini, G., Andreani, M., Roncarolo, M.G., and Gregori, S. 2011. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *European journal of immunology* 41:1652-1662.
11. Bacchetta, R., Bigler, M., Touraine, J.L., Parkman, R., Tovo, P.A., Abrams, J., de Waal Malefyt, R., de Vries, J.E., and Roncarolo, M.G. 1994. High levels of interleukin 10 production in vivo are associated with tolerance in SCID patients transplanted with HLA mismatched hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine* 179:493-502.
12. McLamon, A. 2012. IBD: Regulatory T-cell therapy is a safe and well-tolerated potential approach for treating refractory Crohn's disease. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*.
13. Desreumaux, P., Foussat, A., Allez, M., Beaugerie, L., Hebuterne, X., Bouhnik, Y., Nachury, M., Brun, V., Bastian, H., Belmonte, N., et al. 2012. Safety and Efficacy of Antigen-Specific Regulatory T-Cell Therapy for Patients With Refractory Crohn's Disease. *Gastroenterology*.
14. Wang, L., Toda, M., Saito, K., Hori, T., Horii, T., Shiku, H., Kuribayashi, K., and Kato, T. 2008. Post-immune UV irradiation induces Tr1-like regulatory T cells that suppress humoral immune responses. *International immunology* 20:57-70.

AGRAÏMENTS

Agraïco a tots els meus col·laboradors, en el present i el passat, per les seves contribucions intel·lectuals i tècniques en el desenvolupament de les idees que presento en aquest manuscrit.

També agraïco a la Dra. Sue Tsai per les il·lustracions i a la Dra. Mercè Martín Peña per el seu ajut en la redacció d'aquest article.

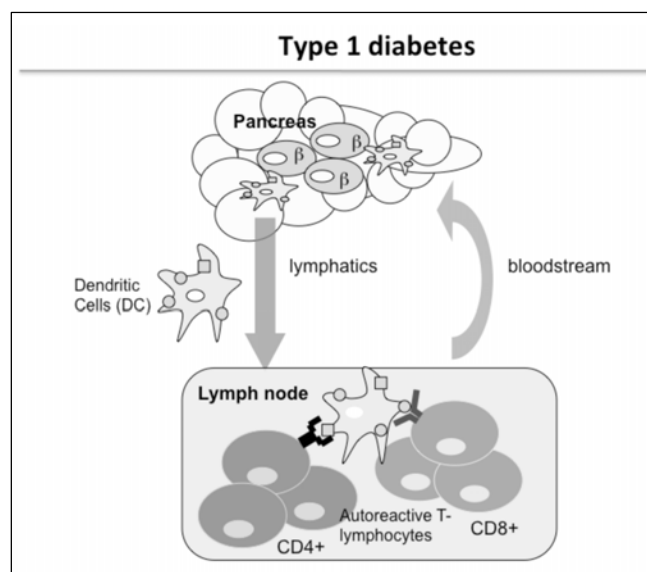


Figura 1. Patogènesi de la T1D.

Els autoantígens alliberats per les cèl·lules beta pancreàtiques són capturats per les cèl·lules APC residents als teixits, com les cèl·lules dendrítiques (DC per Dendritic Cells) o les cèl·lules B, i transportats per aquestes cap als nòduls limfàtics drenants. Aquí les DCs carregades d'autoantígens indueixen l'activació de les cèl·lules T CD4+ i CD8+ en efectores citotòxiques contra la cèl·lula beta, les quals migren cap l'òrgan diana (el pàncreas) pel torrent sanguini. La mort cel·lular mediada per les cèl·lules T amplifica l'alliberació d'autoantígens, els quals incrementen l'activació i el recrutament d'efectors addicionals, donant lloc a la completa destrucció de les cèl·lules beta i a la deficiència d'insulina. La il·lustració és cortesia de Sue Tsai.

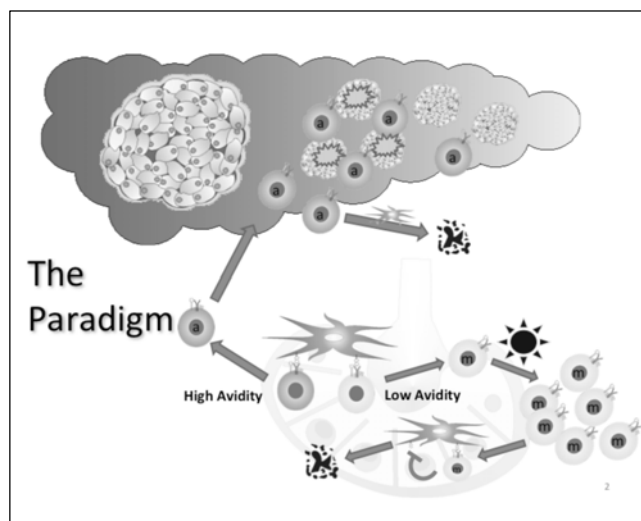


Figura 2. Modus operandi de les pMHC-NP.

Les NPs recobertes de pMHC indueixen la supressió de les cèl·lules T d'alta avidesa, tant les «naïves» (no activades) com les activades recents, i expandeixen les cèl·lules T autoreguladores de memòria, les quals apareixen predominantment (durant la progressió de la T1D) a partir de precursors no patogènics de baixa avidesa. Les cèl·lules de baixa avidesa amb fenotip de memòria autoreactives, expandides per efecte de les pMHC-NPs, inhibeixen la presentació d'autoantígens per les APCs locals en els nòduls limfàtics regionals (que porten autoantígens tant afins com no afins).

Aquesta supressió actuarà selectivament sobre les APCs mostrant els pMHC afins, però com les APCs locals que capturen els autoantígens afins també capturen els altres antígens de manera simultània, les cèl·lules T autoreguladores expandides per les pMHC-NPs bloquegen la presentació d'altres complexos de pMHC abastant un ampli ventall de cèl·lules T autoreactives. La il·lustració és cortesia de Sue Tsai.

PERESANTAMARIAi VILANOVA

- Nascut a Manresa (Bages) el 28-06-1960.
 - Llicenciat en Medicina i Cirurgia (UB, 1983) i Doctor (UB, 1987).
 - Especialista en Immunologia (1987).
 - Estadies postdoctorals (1988-1992) al Departament de Medicina i a l' Institut de Genètica Humana de la Universitat de Minnesota a Minneapolis (EEUU).
 - Assistant Professor (1992-1996), Associate Professor (1996-2002) i Full Professor (2002-) i Cap en funcions (2002) del Departament de Microbiologia, Immunologia i Malalties Infeccioses de la Universitat de Calgary a Alberta (Canadà).
 - Director del "Julia MacFarlane Diabetes Research Centre" (2004-) i del "Immunology Research Group" (2010-) de la Facultat de Medicina de la Universitat de Calgary.
 - Director de Grup de Recerca (2011-) a l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS) a Barcelona.
 - Acadèmic electe corresponent: 2012.
 - Ingress corresponent: 11-12-2012.
- Resposta: Dr. Lluís Guerrero i Sala

